ORIGINAL ARTICLE

Contamination of Traditional Cheese in Mazandaran Province to Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus

Maryam Azizkhani,
Fahimeh Tooryan

Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

(Received September 18, 2017 ; Accepted February 6, 2018)

Abstract

Background and purpose: Prevalence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* strains in foodstuff is becoming a serious health problem, especially in developing countries. This research was conducted to investigate the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in traditional cheese samples in Mazandaran province, Iran.

Materials and methods: In this descriptive cross-sectional study, the presence of MRSA was investigated using specific *mecA* primers by PCR in 360 cheese samples in Mazandaran province, which were collected during one year. The resistance of isolates to vancomycin, erythromycin, oxacillin, ciprofloxacin, penicillin, tetracycline, gentamycin, and cotrimoxazol was determined through disc diffusion method.

Results: Among the samples tested, 62.2% were contaminated by *S. aureus* (average count of 3.96 log cfu g^{-1}). From 224 isolates 199 (88.8%) were methicillin-resistant. MRSA resistance to antibiotics was as follows: gentamycin 77%, cotrimoxazol 75%, vancomycin 68%, ciprofloxacin 60%, oxacillin 52%, tetracycline 29%, erythromycin 15%, and penicillin 10%.

Conclusion: The results showed high levels of contamination to MRSA in traditional cheese samples. Proper hygienic handling in farms, using pasteurized milk, and providing people with ample information about health guidelines could prevent cross contamination during processing and prevalence of the bacteria in traditional products.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, traditional cheese, drug resistance, MRSA

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (163): 47-56 (Persian).

*** Corresponding Author: Maryam Azizkhani-** Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran (E-mail: azizkhani.maryam@gmail.com)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۳ مرداد سال ۱۳۹۷ (۵۶-۴۷)

بررسی میزان آلودگی پنیرهای سنتی استان مازندران به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

مریم عزیزخانی

فهیمه توریان

چکیده

سابقه و هدف: وجود سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک در مواد غذایی در حال تبدیل شدن به مشکلی جدی در بخش بهداشت عمومی و درمان به خصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی آلودگی پنیر سنتی به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) در استان مازندران انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، بررسی میزان حضور MRSA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA* به روش PCR روی ۳۶۰ نمونه پنیر سنتی در استان مازندران که طی یک سال جمع‌آوری شده بود، انجام شد. مقاومت سویه های MRSA جدا شده از نمونه های پنیر در برابر ونکومایسین، اریترومایسین، اگزاسیلین، سیپروفلوکساسین، پنی سیلین، تتراسایکلین، جنتامایسین و کوتریموکسازول به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد.

یافته‌ها: ۶۲/۲ درصد از نمونه های مورد آزمون با میانگین شمارش $3/96 \log cfu\ g^{-1}$، آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده‌اند. ۱۹۹ جدایه از ۲۲۴ جدایه (۸۸/۸ درصد) به دست آمده، مقاوم به متی‌سیلین بودند. مقاومت سویه‌های MRSA در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها عبارت بود از: جنتامایسین ۷۷ درصد، کوتریموکسازول ۷۵ درصد، ونکومایسین ۶۸ درصد، سیپروفلوکساسین ۶۰ درصد، اگزاسیلین ۵۲ درصد، تتراسایکلین ۲۹ درصد، اریترومایسین ۱۵ درصد و پنی‌سیلین ۱۰ درصد.

استنتاج: نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی در پنیرهای سنتی تهیه شده در استان مازندران به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌باشد. بایستی با رعایت اصول بهداشتی در دامداری‌ها، به کار بردن شیر پاستوریزه در تهیه پنیر و نیز آموزش بهداشت عمومی در سطح کارگاهی جهت جلوگیری از بروز آلودگی‌های ثانویه طی فرایند تولید پنیر از شیوع گسترده این باکتری در محصولات سنتی پیشگیری نمود.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، پنیر سنتی، مقاومت دارویی، MRSA

مقدمه

پنیر یکی ازمهم‌ترین فرآورده‌های لبنی غنی از پروتئین و کلسیم به شمار می‌رود که برای عمده مصرف‌کنندگان حتی افراد دچار عارضه عدم تحمل لاکتوز قابل استفاده می‌باشد(۱). با توجه به به آمارهای منتشر شده میزان تولید

مولف مسئول: مریم عزیزخانی- آمل: خیابان امام خمینی، خیابان آفتاب ۲۴ E-mail: azizkhani.maryam@gmail.com
استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۶/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۶/۲۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱۱/۱۶

سالیانه پنیر داخلی بیش از ۱۰۰ هزار تن تخمین زده می‌شود که شامل پنیرهای صنعتی و سنتی می باشند(۲). عفونت‌ها و مسمومیت‌های منتقله از مواد غذایی همواره از مشکلات عمده بهداشت جهانی بوده و در کشور ما نیز این مساله هر ساله خسارات بهداشتی و اقتصادی قابل توجهی به بار می‌آورد. شیر و فرآورده‌های آن، منابع غذایی غنی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های بیماریزا (مانند *سالمونلا، لیستریا، کمپیلوباکتر، استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس و میکروکوکوس*) محسوب می‌شوند(۶-۳). ورود این میکروارگانیسم‌های بیماریزا به شیر و محصولات لبنی طی شیردوشی از بخش‌های مختلف بدن دام، ذرات هوای محل شیردوشی، حشرات و جوندگان، منبع آب، ابزار و تجهیزات شیردوشی، ظروف حمل و نگهداری شیر و نیز دست‌ها و لباس فرد شیردوش رخ می‌دهد(۷). از آن‌جاکه معمولاً در تولید پنیر سنتی (دهقانی) از شیر خام و غیرپاستوریزه استفاده می شود، لذا یکی از مسایل حائز اهمیت در تولید پنیر سنتی، وضعیت آلودگی میکروبی آن است(۸). در صورتی که شیر حاوی باکتری‌های بیماریزا باشد و یا طی فرآیند تولید پنیر آلودگی ثانویه رخ دهد، این امر منجر به بروز مسمومیت غذایی ناشی از وجود میکروارگانیسم‌ها و یا توکسین‌های تولید شده توسط آن‌ها می گردد(۹).

علاوه بر پتانسیل تکثیر میکروارگانیسم‌های بیماریزا در شیر و محصولات لبنی، نگرانی مهم دیگر، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی است که در حال تبدیل شدن به مشکلی جدی در بخش دارو و درمان به خصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد(۱۲-۱۰). علاوه بر احتمال وجود طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها در شیر و فرآورده های لبنی، مطالعات متعدد نشان داده اند که حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه شیر خام و حتی در شیر پاستوریزه بسیار معمول بوده و باکتری در این محیط‌ها قادر به تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت بوده است(۱۴،۱۳).

در مطالعه Nusrat و همکاران (۲۰۱۵)، نمونه‌های شیر خام و پنیر سنتی مورد مطالعه در شهر داکا (بنگلادش) به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بوده‌اند. هم‌چنین درصدی از سویه‌های جدا شده از نمونه‌های پنیر و شیر خام حداقل در برابر دو آنتی بیوتیک متداول مقاوم بوده‌اند(۱۲). رضایی و همکاران (۱۳۹۳) نیز گزارش نمودند که بخشی از نمونه‌های پنیر سنتی توزیع شده در استان مرکزی آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت بوده اند(۱۵).

در مطالعه صالحی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در برخی از نمونه‌های پنیر سنتی لیقوان توزیع شده در شهرستان تهران، آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت مشاهده گردید(۱۶). مطالعات معدود دیگری نیز در رابطه با وضعیت بهداشتی شیر و محصولات لبنی در ایران انجام شده اما هیچ گزارشی در این خصوص در استان مازندران در دسترس نمی باشد. لذا، این مطالعه با هدف بررسی آلودگی پنیر سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در استان مازندران انجام شد.

مواد و روش ها

۳۶۰ نمونه پنیر سنتی در کیسه‌های پلی اتیلن استریل از فروشگاه های شهرهای مختلف استان مازندران، از تیر ۱۳۹۵ الی خرداد ۱۳۹۶، به روش نمونه‌گیری تصادفی و مطابق راهنمای استاندارد ملی برای نمونه‌برداری شیر و فرآورده‌های آن جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند(۱۷).

جهت کشت و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه، ابتدا رقت های مورد نیاز تهیه شد. برای تهیه اولین رقت از عمق تکه های پنیر با استفاده از قاشق فلزی استریل، ۲۵ گرم نمونه برداری و در هاون چینی استریل یکنواخت گردید. سپس، نمونه همگن شده با ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده اولیه پنیر (کلرید سدیم ۰/۵ درصد، کازیتون ۱ درصد و سیترات سدیم ۲ درصد) (مرک، آلمان) به‌مدت ۲ دقیقه توسط استومیکر (آی‌یوال،

اسپانیا) همگن گردید و سپس رقت‌های مورد نظر تهیه شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در سطح سه پلیت حاوی محیط کشت برد پارکر آگار (مرک، آلمان) انتقال داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. کلنی‌های سیاه، محدب، براق با هاله روشن در اطراف به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* شمارش و آزمون‌های تائیدی کوآگولاز، کاتالاز، ترمونوکلئاز و تخمیر گلوکز و مانیتول انجام شد(۱۸).

جهت استخراج DNA از محلول استخراج Tripure (روشه، ایالات متحده) استفاده و کلیه مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. جهت بررسی کمی و تعیین غلظت DNA، دانسیته نوری ۲ میکرولیتر از محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (ترموساینتیفیک، ایالات متحده) قرائت و بر اساس نانوگرم در میکرولیتر گزارش شد. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) بیانگر عدم وجود آلودگی و خلوص DNA می‌باشد.

پرایمرهای به کار رفته جهت انجام PCR و شمارش MRSA با استفاده از نرم‌افزار Primer-BLAST طراحی شدند(جدول شماره۱). توالی ژن *mecA* از بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج گردید. جهت به دست آوردن منحنی ذوب پرایمرها، دامنه حرارتی ۹۵-۷۰ درجه سانتی‌گراد با شیب ۱ درجه سانتی‌گراد در دقیقه اعمال شد.

واکنش Real Time PCR جهت جستجوی ژن *mecA* با استفاده از محلول Power SYBR Green (Applied Biosystems, USA) انجام شد، مستر میکس تهیه‌شده شامل پرایمرهای forward و reverse ۱ میکرولیتر، الگوی DNA (غلظت نهایی ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱۰میکرولیتر مسترمیکس Power SYBR Green و آب فاقد نوکلئاز بود. واکنش در یک ترموسایکلر ABI PRISM 7,500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) انجام شد. شرایط چرخه حرارتی واکنش به صورت زیر بود: یک سیکل در ^{o}C ۵۰ به مدت ۲ دقیقه، یک سیکل در ^{o}C ۹۵ به مدت ۲ دقیقه، ۴۰ چرخه در ^{o}C ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه و ^{o}C ۶۰ به مدت ۱ دقیقه. آنالیز کلیه نمونه‌ها در سه تکرار صورت گرفت. از ژن *16S rRNA* به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 2405 به عنوان کنترل منفی به کار رفت.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت شمارش MRSA

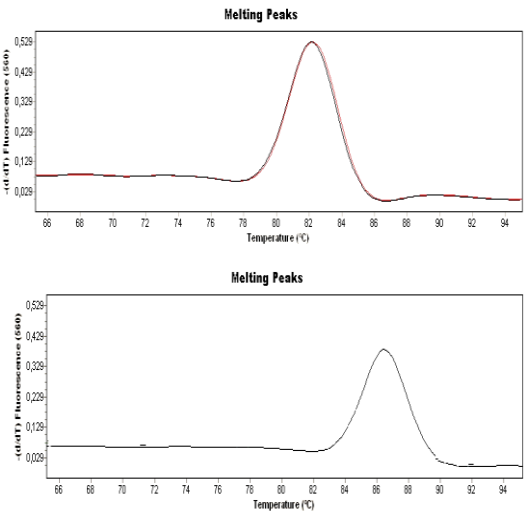
نام پرایمر	توالی (5'→3')	طول (bp)	دمای ذوب (°C)
mecA-F	TGGCAGACAAATTGGGTGGT	۲۱۵	۶۱/۱۱
mecA –R	TGAAGCAACCATCGTTACGGA		
16s rRNA-F	GCTGCCCTTTGTATTGTC	۲۷۸	۶۰
16s rRNA-R	AGATGTTGGGTTAAGTCCC		

مقاومت سویه‌های MRSA جدا شده از نمونه‌های پنیر در برابر ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اگزاسیلین(۱ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۲۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم) به روش دیسک دیفیوژن و مطابق دستورالعمل و استاندارد Clinical and Laboratory Standards Institute تعیین شد(۱۹). بدین‌منظور، دیسک‌های کاغذی آغشته به غلظت‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک‌ها (مرک، آلمان) بر سطح محیط مولر هینتون آگار تلقیح شده با MRSA قرار داده شد. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. قطر منطقه بازداری رشد اطراف دیسک آنتی بیوتیکی اندازه‌گیری شد. قطر هاله کوچک تر از ۹، ۱۳، ۱۰، ۱۵، ۲۸، ۱۴، ۱۲ و ۱۵ میلی‌متر به عنوان مقاومت، به ترتیب، برای ونکومایسین، اریترومایسین،اگزاسیلین، سیپروفلوکساسین، پنی سیلین، تتراسایکلین، جنتامایسین و کوتریموکسازول در نظر گرفته شد(۱۹). تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس

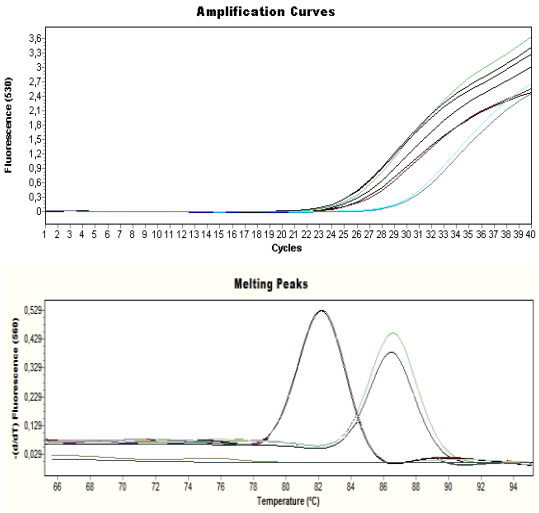
آنالیز آماری توصیفی، بررسی فراوانی و آزمون مربع کای و با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS انجام شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نشان داده شد. فاصله اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته ها

منحنی ذوب مربوط به محصولات ژن‌های مورد استفاده در PCR، هم‌چنین نمودارهای تکثیر و ذوب نمونه‌های جمع‌آوری شده در تابستان، به ترتیب در نمودارهای شماره ۱ و ۲ آورده شده‌اند. نتایج به دست آمده از جستجوی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیماریزا (کاتالاز مثبت، کوآگولاز مثبت و ترمونوکلئاز مثبت) در نمونه‌های پنیر سنتی (جدول شماره ۲) نشان داد که ۲۲۴ نمونه از ۳۶۰ نمونه مورد آزمون (۶۲/۲ درصد) با میانگین شمارش $\log \text{cfu } g^{-1}$ ۳/۹۶ آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده‌اند. میانگین شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیرهای سنتی عرضه شده در استان مازندران در فصل پاییز، زمستان، بهار و تابستان به ترتیب برابر بود با $\log \text{cfu } g^{-1}$ ۳/۱۵، $\log \text{cfu } g^{-1}$ ۲/۴۹، $\log \text{cfu } g^{-1}$ ۴/۵۲ و $\log \text{cfu } g^{-1}$ ۵/۶۷.



تصویر شماره ۱: منحنی ذوب مربوط به محصولات (الف) ژن *mecA* و (ب) *16s rRNA*-F در PCR

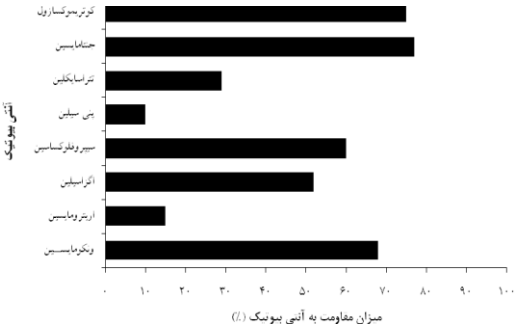


تصویر شماره ۲: نمودارهای تکثیر و ذوب نمونه های جمع آوری شده در تابستان؛ (الف) ژن *mecA* و (ب) *16s rRNA*-F

جدول شماره ۲: میانگین شمارش تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های پنیر سنتی استان مازندران

زمان نمونه گیری	تعداد نمونه	تعداد نمونه های مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (درصد)	انحراف معیار ± میانگین	تعداد نمونه های مثبت MRSA
تیر	۳۰	۲۵ (۸۳/۳)	۵/۷۵±۰/۳۵	۲۱
مرداد	۳۰	۲۸ (۹۳/۳)	۶/۴۲±۰/۸۷	۲۷
شهریور	۳۰	۲۷ (۹۰/۰)	۴/۸۶±۰/۲۵	۲۵
مهر	۳۰	۲۰ (۶۶/۶)	۳/۹۱±۰/۵۵	۱۹
آبان	۳۰	۱۵ (۵۰)	۲/۸۰±۰/۴۶	۱۳
آذر	۳۰	۱۶ (۵۳/۳)	۲/۷۴±۰/۶۰	۱۴
دی	۳۰	۱۲ (۴۰)	۱/۵۹±۰/۳۷	۹
بهمن	۳۰	۱۱ (۳۶/۶)	۲/۶۴±۰/۷۱	۹
اسفند	۳۰	۱۱ (۳۶/۶)	۳/۲۵±۰/۲۰	۸
فروردین	۳۰	۱۵ (۵۰)	۳/۳۳±۰/۶۴	۱۳
اردیبهشت	۳۰	۲۲ (۷۳/۳)	۴/۵۴±۰/۷۵	۲۰
خرداد	۳۰	۲۲ (۷۳/۳)	۵/۷۱±۰/۴۱	۲۱
مجموع	۳۰	۲۲۴ (۶۲/۲)	۳/۹۶±۰/۵۱	۱۹۹

نتایج آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن مربوط به مقاومت در برابر متی سیلین (*mecA*) نشان داد که در مجموع ۸۸/۸ درصد (۱۹۹ از ۲۲۴ جدایه) از جدایه‌های به دست آمده مقاوم به متی‌سیلین می‌باشند. تفاوت معنی‌داری در تعداد جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین بین مناطق غربی و شرقی استان وجود نداشت (به ترتیب، ۹۷ و ۱۰۲ جدایه) ($p> ۰/۰۵$). میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از نمونه‌های پنیر سنتی در تصویر شماره ۳ آورده شده است.



تصویر شماره ۳: میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از نمونه های پنیر سنتی در استان مازندران

۷ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیماریزای به دست آمده از نمونه‌های پنیر سنتی در سطح استان به کلیه آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته در این مطالعه حساسیت نشان دادند. سایر جدایه‌ها نسبت به یک یا در مواردی بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از روش دیسک دیفوزیون، از میان ۱۹۹ جدایه به دست آمده از نمونه‌های پنیر سنتی در سطح استان، تعداد ۴۸ جدایه (۲۴ درصد) به ۱ آنتی‌بیوتیک، ۲۹ جدایه (۱۴/۵ درصد) به ۲ آنتی‌بیوتیک، ۳۷ جدایه (۱۸/۵ درصد) به ۳ آنتی‌بیوتیک، ۱۹ جدایه (۹ درصد) به ۴ آنتی‌بیوتیک، ۲۵ جدایه (۱۲/۵ درصد) به ۵ آنتی‌بیوتیک، ۱۰ جدایه (۵ درصد) به ۶ آنتی‌بیوتیک، ۱۰ جدایه (۵ درصد) به ۷ آنتی‌بیوتیک و ۷ جدایه (۳/۵ درصد) به ۸ آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده‌اند.

بحث

با توجه به این که فرآورده‌های شیر در زمره مواد غذایی پرمصرف در کشور قرار داشته و پنیر یکی از محصولات لبنی اصلی در سبد غذایی خانوار به شمار می‌رود، پایش وضعیت بهداشتی، آلودگی میکروبی و ایمنی مصرف آن به خصوص در مورد پنیرهای سنتی ضروری به نظر می‌رسد. جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های پنیر سنتی (غیرپاستوریزه) نشان‌دهنده وقوع آلودگی از منبع تهیه پنیر (شیر غیرپاستوریزه) و نیز از طریق آلودگی ثانویه طی تولید سنتی از جمله ظروف تهیه پنیر و هم‌چنین انتقال باکتری از افراد در تماس با محصول طی فرآیند، نگهداری، توزیع و فروش می‌باشد(۲۱،۲۰). از آن‌جاکه *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت و شیره معده می‌باشد، مصرف ماده غذایی آلوده به انتروتوکسین استافیلوکوکی می‌تواند موجب بروز علائم مسمومیت هم‌چون تهوع، استفراغ، دردهای شکمی و اسهال گردد(۲۲،۱۹).

مطابق نتایج به دست آمده، با افزایش دمای هوا در اواخر بهار و تابستان تعداد باکتری مورد بررسی در نمونه‌های این فصول نسبت به نمونه‌های برداشت شده در ماه‌های سرد سال بیش‌تر بوده است ($p< ۰/۰۵$)، احتمالاً این تفاوت به علت نزدیکی دمای ماه‌های گرم در مازندران به دمای مطلوب رشد این باکتری می‌باشد. میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* کاتالاز مثبت، کوآگولاز مثبت و ترمونوکلئاز مثبت در نمونه‌های جمع‌آوری شده از شرق استان مازندران بیش‌تر از مناطق غربی این استان بوده است، البته این تفاوت معنی‌دار نبوده است. طبق بررسی‌های انجام شده طی این تحقیق در معدودی از کارگاه های سنتی در غرب استان از شیر حرارت دیده برای تولید پنیر استفاده می‌شود که می‌تواند بار میکربی محصول را تا حدودی کاهش دهد. به‌طور کلی، یافته‌های حاضر نشان دهنده میزان قابل ملاحظه‌ای از آلودگی در این محصول در سطح استان می‌باشد. نتایج بررسی ۱۰۰ نمونه پنیر غیرپاستوریزه جمع‌آوری شده از نقاط مختلف شهر تهران در سال‌های ۱۳۷۸-۱۳۷۷ حاکی از این بود که ۳ درصد نمونه‌ها آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند(۹). هم‌چنین، در مطالعه‌ای که بر پنیرهای سفید و کره‌های سنتی مناطق مختلف سطح شهرستان تبریز انجام شد، در ۲۴ درصد از نمونه‌های پنیر و ۱۶ درصد از نمونه‌های کره آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید(۲۳). در بررسی وضعیت آلودگی میکروبی پنیرهای سنتی توزیع شده در استان مرکزی در سال ۱۳۹۰، ۲۴ درصد نمونه‌ها آلوده

به *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت تشخیص داده شدند(۱۵). میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های پنیر در مطالعات بالا کم‌تر از مطالعه حاضر بوده است که می‌تواند مربوط به عدم رعایت شرایط بهداشتی در مرحله دوشش، حرارت دادن شیر قبل از تولید پنیر، شرایط بهینه بهداشتی در محل تولید و نیز فصل نمونه‌گیری باشد. صالحی و همکاران (۱۳۹۲) نیز به ارزیابی میزان آلودگی پنیر سنتی لیقوان به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت در سطح شهرستان تهران پرداختند. نتایج کار ایشان نشان داد که از مجموع ۲۵ نمونه، ۲۲ نمونه (۸۸ درصد) به *استافیلوکوکوس* آلودگی داشته و ۱۴ مورد (۶۳/۶ درصد) بیش ازحد استاندارد(۲۴) به *استافیلوکوکوس* و ۵ نمونه (۲۲/۷ درصد) به *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت آلودگی داشتند(۱۶).

در مطالعه‌ای دیگر در خصوص بررسی شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سفید سنتی آب نمکی، در ۱۳۰ نمونه مورد آزمایش، ۵۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شد و از این تعداد ۶ جدایه (۱۰/۹ درصد) حامل ژن تولید انتروتوکسین A بوده‌اند(۲۵). در پژوهشی که بر روی پنیر سنتی کوزه در شهرستان سقز انجام شد نتایج نشان داد که ۴۱ نمونه از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده اند(۲۶).

Akinden و همکاران (۲۰۰۸) طی بررسی وضعیت آلودگی پنیرهای تهیه شده از شیر بز در شهر هس (آلمان) اعلام نمودند که ۱۷/۷ درصد از نمونه‌های مورد آزمایش آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین‌زا بوده‌اند(۲۷).

Nusrat و همکاران (۲۰۱۵) در یک بررسی در شهر داکا (بنگلادش) گزارش نمودند که از ۸۰ نمونه مورد آزمایش، ۱۷ نمونه شامل ۹ نمونه شیر خام و ۸ نمونه پنیر سنتی آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین بوده‌اند(۱۲). عامل اصلی آلودگی پنیر سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* به کار بردن شیر خام در تهیه این نوع از پنیرها می‌باشد و از آن‌جاکه شیر خام در مراحل مختلف از جمله دوشش از دام مبتلا به ورم پستان، بهداشتی نبودن ظروف نگهداری و حمل و نقل و تماس با افراد آلوده در معرض آلودگی قرار دارد، احتمال شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیرهای سنتی بسیار بالاست. عمده پنیرهای سنتی عرضه شده در فروشگاه‌های استان مازندران در روستاها و به روش سنتی تهیه می‌شوند، لذا احتمال انتقال آلودگی در کلیه مراحل تولید وجود دارد.

شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین یک تهدید جهانی برای سلامت و امنیت بهداشتی افراد در همه جوامع به شمار می‌رود. در مطالعه Nusrat و همکاران (۲۰۱۵)، ۵۸/۸ درصد از جدایه‌های کوآگولاز مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین تشخیص داده شدند(۱۲). درکشورهای در حال توسعه، بیش از ۷۰ درصد باکتری‌های بیماریزا به عنوان سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک شناسایی شده‌اند(۲۸،۱۱) و در چندین مطالعه وجود این سویه‌ها در شیر و فرآورده‌های لبنی اثبات شده است(۱۲،۵). نتایج حاصل از بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی نیز نشان داد که به ترتیب ۹۰ و ۸۵ درصد از جدایه‌ها مقاوم به پنی‌سیلین و اریترومایسین می‌باشند که این میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به این دو آنتی‌بیوتیک متداول بسیار بالا و مخاطره آمیز است. در مطالعات دیگر نیز میزان بالایی از مقاومت در برابر پنی سیلین (بالاتر از ۹۰ درصد) مشاهده شده است(۲۶). مقاومت جدایه‌ها نسبت به اریترومایسین (۸۵ درصد) در این پژوهش، نسبت به نتایج مطالعات سایر محققان، خلیفه‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) (۳۴/۱ درصد) و Daka و همکاران (۲۰۱۲) (۳۲/۱ درصد) بالاتر است (۲۶، ۲۹) اما به نتایج به دست آمده توسط Moon و همکاران (۲۰۰۷) (۷۹/۵ درصد) نزدیک‌تر می باشد(۲۲). بیش‌ترین حساسیت نسبت به جنتامایسین (۷۷ درصد)، کوتریموکسازول (۷۵ درصد) و ونکومایسین (۶۸ درصد)

مشاهده شد. در مطالعه خلیفه زاده و همکاران (۱۳۹۳) در سقز(۲۶)، میرزایی و همکاران (۲۰۱۲) در تبریز(۳۰) و Thaker و همکاران (۲۰۱۳) در آنانـد در هنـد(۳۱) نیـز نتایج تقریباً مشابهی به دست آمد، لیکن میزان حساسیت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به سه آنتی‌بیوتیک اخیر در مطالعه این سه محقق بیش تر بوده است و به‌نظر می‌رسد این امر به علت تفاوت در شـرایط اقلیمـی و نیـز داروهای ضدمیکروبی مورد استفاده در دامـداری‌هـا باشـد. در این مطالعه، ۵۲ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به اگزاسیلین حساس بودند که در مقایسه بـا مقاومـت ۳۹/۲ درصـدی در مطالعـه خلیفـه زاده و همکاران (۱۳۹۳) حاکی از روند رو به رشـد سـویه‌هـای مقاوم به اگزاسیلین در منابع غـذایی در ایـران مـی‌باشـد(۲۶)، لیکن در مطالعه Nusrat و همکاران (۲۰۱۵) در بـنگلادش، ۱۰۰ درصـد جدایـه‌هـا بـه اگزاسـیلین مقاومـت نشـان دادند(۱۲). بررسی مقاومـت آنتـی‌بیـوتیکی در خصـوص سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین نشان دهنـده حساسـیت به ترتیب ۶۰ و ۲۹ درصـدی جدایـه‌هـا مـی‌باشـد. نتـایج حاصـل از پـژوهش حاضـر نشـان‌دهنـده میـزان بـالای آلودگی در پنیرهای سنتی تهیه شده در استان مازنـدران بـه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* مقـاوم بـه آنتـی‌بیوتیـک می‌باشد و تداوم این آلودگی بی‌تردید منجر به شکسـت برنامه‌های درمانی آنتی‌بیوتیکی در خصوص بیماری‌های عفونی انسانی و دامی می‌گـردد. لـذا بایسـتی بـا رعایـت اصول بهداشتی در دامداری‌ها جهت پیشگیری از وقـوع ورم پستان در دام و درمان محتاطانه این عارضه، نظارت مداوم بر وضعیت بهداشت دامـداری‌هـای تـامین کننـده شـیر و نیـز آمـوزش بهداشـت عمـومی حتـی در سـطح کارگاهی جهت جلوگیری از بروز آلودگی‌هـای ثانویـه طی فرایند تولید پنیر و محصولات سنتی مشابه از شـیوع گسترده این باکتری در محصولات سـنتی پیشـگیری نمـود. هم‌چنین، ترویج روش‌های صحیح و بهداشـتی تولیـد از جمله جوشاندن شیر خام قبل از تهیه پنیر سـنتی و تخصـیص زمان لازم جهت تخمیـر و کـاهش اسـیدیته پنیـر جهـت جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماریزا پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب پروژه تحقیقاتی بـا اسـتفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی دانشگاه تخصصـی فنـاوری‌هـای نوین آمل انجام گردیده است.

References

1. Pawłowska K, Umławska W, Iwańczak B. The impact of lactose malabsorption and lactose intolerance on dairy consumption in children and adolescents with selected gastrointestinal diseases. Pediatria Polska 2016; 91(3): 192-198.
2. Rajaee M. Whey properties and ways of its usage. 2018; https://ganj-old.irandoc. ac.ir/ articles/358109. Accessed May 2, 2018.
3. Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR, Hegde NV. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. J Dairy Sci 2004; 87(10): 3561-3573.
4. Jayarao BM, Donaldson SC, Straley BA, Swant AA, Hegde NV, Brown JL. A survey offood- borne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. J Dairy Sci 2006; 89(7): 2451-2458.
5. Marjan S, Das KK, Munshi SK, Noor R. Drug-resistant bacterial pathogens in milk and some milk products. Nut Food Sci. 2014; 44(3): 241-248.
6. Okpalugo J, Ibrahim K, Izebe KS, Inyang US. Aspects of microbial quality of some milk products in Abuja, Nigeria. Trop J Pharm Res 2008; 7(4): 1169-1177.

7. Parekh TS, Subhash R. Molecular and bacteriological examination of milk from different milch animals with special references to coliforms. Curr Res Bacteriol 2008; 1(2): 56-63.
8. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br J Pharmacol. 2008; 153(Supple,1): 347-357.
9. Salek Moghadam A, Farvahash Tehrani H, Ansari H, Ravadgar B, Noorani Vatani A, Ghasemi M. A Survey of microbial contamination of non-pasteurized cheese versus pasteurized cheese and the effect of different amounts of salt added to cheese on pathogen bacteria. J Iran Univ Med Sci 2001; 8(25): 175-181 (Persian).
10. Ahmed T, Baidya S, Sharma BC, Malek M, Das KK, Acharjee M, Malek M, Das KK, Acharjee M, Munshi SK, Noor R. Identification of drug-resistant bacteria among export quality shrimp samples in Bangladesh. Asian J Microbiol Biotechnol Env Sci 2013; 15(4): 31-36.
11. Dutta S, Hasan MR, Rahman F, Jilani MSA, Noor R. Study of antimicrobial susceptibility of clinically significant microorganisms isolated from selected areas of Dhaka, Bangladesh. Bangladesh J Med Sci 2013; 12(1): 34-42.
12. Nusrat J, Ifra TN, Mrityunjoy A. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within raw milk and cheese samples. Int Food Res J 2015; 22(6): 2629-2633.
13. Shanehbandi D, Baradaran B, Sadigh-Eteghad S, Zarredar H. Occurrence of methicillin resistant and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in traditional cheeses in the north west of Iran. ISRN Microbiol 2014; http://dx.doi.org/10.1155/2014/129580.
14. Zinke C, Winter M, Mohr E, Krömker V. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cheese produced in German farm-dairies. Adv Microbiol 2012; 2(4): 629-633.
15. Rezaee M, Yahyaee M, Parviz M, Khodaee Motlagh M. A survey of microbial contamination in Traditional Cheese distributed in Markazi Province in 2010. Iran J Health Environ 2014; 7(1): 115-121 (Persian).
16. Salehi A, Dehghanifard A, Ali-Mohammadi M. A survey of contamination of Traditional Lighvan Cheese distributed in Tehran to coagulase-positive *Staphylococcus aureus*. J Environ Health Eng 2013; 1(2): 130-136 (Persian).
17. Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). Milk and milk products – Guidance on sampling. 2008; No. 326. URL: http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=5117 (Persian).
18. Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). Microbiology of food and feed- Enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus aureus.* part 1: using Baird Parker Agar culture. 2005; No. 6806. URL: http://www.isiri.org/portal/files/std/6806.pdf. (Persian).
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty–Second informational Supplement 2012; 3(1): M100-S22.
20. Chye FY, Abdullah A, Ayob MK. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. Food Microbiol 2004; 21(5): 535-541.
21. Lues JFR, Venter P, van der Westhuizen H. Enumeration of potential microbiological hazards in milk from a marginal urban settlement in central South Africa. Food Microbiol 2003; 20: 321-326.

22. Moon JS, Lee AR, Jaw SH, Kang HM, Joo YS, Parke YH, et al. Comparison of antibiogram, Staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among *Staphylococcus aureus* isolated from animal and vegetable sources in Korea. J Food Prot 2007; 70(11): 2541–2548
23. Mirzaei H, Farhoudi H, Tavassoli H, Farajli M, Monadi A. Presence and antimicrobial susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk and ice cream in Tabriz by culture and PCR techniques. African J Microbiol Res 2012; 6(32): 6224-6229.
24. Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). Microbiology of milk and milk products. 2008; No. 2406. URL: http://www.isiri.org/portal/files/std/2406.pdf. (Persian).
25. Mohammadi M. Distribution of enterotoxin A gene in *Staphylococcus aureus* isolated from traditional brine white cheese. Compar Pathobiol 2014; 11(4): 1473-1480 (Persian).
26. Khalifehzadeh S, Sadeghi Zali MH, Nahaee MR. Prevalence and antibiotics susceptibility of *Staphylococcus aureus* in traditional Kouzeh cheese at Saqqez retails. J Food Hyg 2014; 4(4): 1-9 (Persian).
27. Akineden O, Hassan AA, Schneider E, Usleber E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. Int J Food Microbiol 2008; 124(2): 211-216.
28. Jilani MSA, Murshed M, Sultana L, Hasan Z. Common clinically important aerobic bacteria and their antibiotic resistance pattern of Dhaka city and its vicinity. Bangladesh Med College J 2008; 14: 66-71.
29. Daka D, Silassie S, Yihdego D. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, south ethiopia. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2012; 11(26): 1-6.
30. Mirzaee H, Javadi A, Farajali M, Shah-Mohammadi AR, Monadi Sefidan AR, Barzegar A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in traditional cheese and butter: a field study in Tabriz. J Vet Res 2012; 67(1): 65-70.
31. Thaker HC, Brahmbhatt MN, Nayak JB. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat. Vet World 2013; 6(1): 1-10.